

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Abstract of EP 445.710 A1

The patent application claims the use of zinc hydroxide-calcium hydroxide gel in a process for adjuvant of antigenic solutions and an antigenic solution comprising such gel. The use of i.a. calcium hydroxide in gel combination with zinc hydroxide, lecithin and polyalphaolefine is disclosed and it is in a comparative test illustrated that this adjuvant combination is superior to aluminiumhydroxide, zinc hydroxide in combination with lecithin, and polyalphaolefine, respectively, in its adjuvans effect.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 445 710 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **91103258.9**

(51) Int. Cl. 5: **A61K 39/39**

(22) Anmeldetag: **05.03.91**

(30) Priorität: **08.03.90 DE 4007315**

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1(DE)**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
11.09.91 Patentblatt 91/37

(72) Erfinder: **Bernhardt, Dieter, Dr.
Goldbergstrasse 18a
W-3553 Cölbe(DE)
Erfinder: Hilfenhaus, Joachim, Dr.
Auf'm Gebrande 24
W-3550 Marburg(DE)**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(74) Vertreter: **Klein, Otto, Dr. et al
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)**

(54) Verwendung von Zink-Calciumhydroxid, Lecithin und PAO zur Adjuvierung von Antigenlösungen und auf diese Weise adjuvierte Antigenlösungen.

(57) Es wird ein Verfahren zur Adjuvierung von Antigenlösungen beschrieben, in welchem ein Zinkhydroxid-Calciumhydroxid-Gel und gegebenenfalls zusätzlich ein Lecithin und gegebenenfalls zusätzlich ein Polyalphaolefin zu der Antigenlösung gegeben wird.

EP 0 445 710 A1

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Zink-Calciumhydroxid, Lecithin und PAO zur Adjuvierung von Antigenlösungen sowie auf diese Weise adjuvierte Antigenlösungen.

Viele Antigene sind so wenig immunogen, daß sie nach einmaliger Injektion in ein Tier keine meßbare oder eine nur geringe Immunantwort auslösen. Um die Immunantwort des Organismus auf einen Antigenreiz

- 5 zu verstärken, werden deshalb dem Antigen Adjuvantien zugesetzt. Die meisten inaktivierten Virus- und Bakterienvacinen enthalten aus diesem Grund Adjuvantien. In diesen Virus- und Bakterienimpfstoffen benutzt man überwiegend Al(OH)_3 und AlPO_4 , einzeln oder in Kombination, Pflanzenöle oder aus Erdölfraktionen gewonnene Mineralöle, sogenannte medizinisch pharmazeutische Weißöle nicht exakt definierter Zusammensetzung. Freund's komplettes und inkomplettes Adjuvans enthaltend Mineralöl [®]Bayol F mit und

- 10 ohne Extrakt von Mycobakterien, wird vorwiegend in experimentellen Vaccinen eingesetzt.

Diese Adjuvantien können aber neben Lokalreaktionen auch systemische Nebenwirkungen entfalten.

Neben der lokalen und allgemeinen Verträglichkeit von Adjuvantien sind von Interesse:

1. Ihre immunologischen Wirkmechanismen, also die Wirkung, die sie induzieren;
2. Ihre Pharmakokinetik (Bioabbaubarkeit).

- 15 Zu 1: So ist allgemein bekannt, daß die mineralischen Adjuvantien (Al(OH)_3 , AlPO_4) vorwiegend nur eine humorale Immunantwort induzieren, während die zelluläre Immunität, die bei vielen Virusinfektionen eine dominierende Rolle spielt, nur geringfügig oder gar nicht stimuliert wird.

Anders verhalten sich die Mineralöle und besonders Freund's Adjuvans, die bekanntermaßen sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort stimulieren.

- 20 Zu 2: Die bisher gebräuchlichen Adjuvantien verbleiben größtenteils an der Injektionsstelle oder werden abtransportiert und in anderen Organen des Organismus angereichert, wo sie ihre immunologische und gegebenenfalls toxische Wirkung entfalten, d. h. ein Abbau und eine Ausscheidung findet nicht oder nur sehr verzögert statt.

Anders verhalten sich die Komponenten des erfindungsgemäßen Adjuvans, nämlich Zinkhydroxid-

- 25 Calciumhydroxid-Gel und Lecithin. Diese unterliegen im Organismus dem Stoffwechsel. Sie sind daher weniger toxisch.

In EP-A-0 108 316 (deutsche Offenlegungsschrift 32 41 113) wurde vorgeschlagen, neben anderen Stoffen Verbindungen des Zinks, und zwar Zinksalze als Zuschlagstoffe zu Vaccinen zu verwenden.

- 30 In EP-A-0 343 548 sind Polyalphaolefine (PAO) und in der EP-Anmeldung 89 118565494 Zink-Hydroxidgel und Lecithin als Adjuvantien beschrieben.

Überraschenderweise wurde aber nun gefunden, daß Zinkhydroxid-Calciumhydroxid-Gele, Lecithin und PAO sich zu einem Adjuvans kombinieren lassen, das folgende Eigenschaften aufweist:

1. Das kombinierte Adjuvans hat eine erheblich bessere immunstimulierende Wirkung als jede der 4 adjuvierend wirkenden Einzelkomponenten.
2. Das kombinierte Adjuvans hat überraschenderweise eine bessere allgemein und lokale Verträglichkeit als Zink-Hydroxidgel und Lecithin oder PAO.

Verfahrensbeschreibung der Herstellung von Zinkhydroxid/ Calciumhydroxid-Gel und Lecithin 99-Suspension nach an sich bekannten Verfahren:

- 40 Zinkhydroxid/Calciumhydroxid-Gel:

1. Ausgehend von ZnCl_2 und $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, Herstellung einer 0,1 M-Lösung in Aqua dest. (jeweils 0,1 mol/l);
2. Sterilfiltration der ZnCa-Salzlösung (0,2 μ Membranfilter);
3. Unter sterilen Bedingungen und unter Rühren erfolgt die Zugabe einer Base, vorzugsweise von 10 N NaOH oder 10 N KOH bis ein pH von 6,8 - 7,8 erreicht ist;
4. Das ausgefallene Zinkhydroxid-Calciumhydroxid-Gel kann vorzugsweise durch [®]Ultraturax-Behandlung homogenisiert werden.

- 50 Die hier als Ausgang benutzten ZnCa-Salze sind nur beispielhaft. Ebenso ist es möglich, ein Zinkhydroxid-Calciumhydroxid-Gel unter pH-Kontrolle direkt in einer Antagensuspension herzustellen. Arbeitet man nicht mit sterilen ZnCa-Salzlösungen, sondern unter unsterilen Bedingungen, kann das Gel 20 min bei 120° C autoklaviert werden.

Herstellung einer 20%igen Lecithin 99-Suspension:

1. 20 g Lecithin werden in 100 ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco), pH 7,2 suspendiert;
2. Autoklavieren der Suspension 20 min bei 120° C;
3. Nach Abkühlen wird die Suspension homogenisiert;
4. pH-Einstellung der Suspension mit 10 N NaOH auf 7,0 - 7,8.

Beispielsweise Herstellung einer erfindungsgemäßen Adjuvanskombination (BW 89):

	PAO	26.67 %
5	werden mit R _T ween 81 und R _T ween 80 (beides Polyoxyethylensorbitan-monoester) mittels eines Homogenisators gut gemischt.	6.00 % 2.00 %
10	Unter R _U ltraturaxmischung erfolgt die Zugabe von Zink/Calciumhydroxid-Gel, 0.1 M und Lecithin 99, 20 %ige Suspension	50.00 % 15.33 %
15		=====
		100.00 %

Die so erhaltene Adjuvanskombination kann in jedem beliebigem %-Satz einem Antigen zugesetzt werden.

20 Das Lecithin wird vorzugsweise als 20%ige Suspension zugegeben. Von einer solchen Suspension können 1-10 %, vorzugsweise 5 % zugesetzt werden.

Das Polyalphaolefin wird zu einer Konzentration von 1-40 %, vorzugsweise 10 % zugegeben.

Eine andere Möglichkeit der Adjuvanskombinationsherstellung ist:

1. Die Zugabe von Zink/Calciumhydroxid-Gel und Lecithin 99-Suspension zum Antigen und
- 25 2. Herstellung der W/O Emulsion (Wasser in Öl-Emulsion) mit PAO, Tween 81 und 80 mit der unter 1 beschriebenen Antigen-Adjuvanskombination.

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Adjuvanskombination kann aber auch auf diese Weise erfolgen, wobei alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden:

30	1. PAO	26.67 %
	R _T ween 80	6.00 %
35	R _T ween 81	2.00 %
	werden mittels Ultraturax gut gemischt.	
40	2. Unter Zugabe einer sterilen Lösung von ZnCl ₂ /CaCl ₂ , 0.1 M, und Mischen mittels R _U ltraturax erfolgt die Herstellung einer Wasser-in-Öl(W/O)-	50.00 %
45	Emulsion.	

3. Unter pH-Kontrolle (6,5 - 7,5) erfolgt
durch Zugabe von NaOH, 10 N, unter Mischen
mit dem Ultraturax, die Ausfällung von
Zink/Calciumhydroxid-Gel in der W/O-
Emulsion.

10 4. Danach erfolgt unter Mischen die Zugabe
von Lecithin 99, 20%ig

15.33 %

15 Gesamt 100.00 %

Eine andere Möglichkeit der Adjuvanskombinationsherstellung ist:

- 20 1. Die Zugabe von Zink/Calciumhydroxid-Gel und Lecithin 99 - Suspension zum Antigen und adsorbiert lassen des Antigens und
2. Herstellung der W/O-Emulsion mit PAO, Tween 81 und 80 mit der unter 1 erwähnten Antigen-
Adjuvanskombination.

Die folgenden Beispiele erläutern die Vorteile der erfundungsgemäßen Adjuvanskombination:

25 Beispiel 1:

Aujeszky disease virus (AV) wurde in primären Schweinenierenzellkulturen vermehrt. Nachdem die Kulturen 100%ig virusspezifisch zerstört worden waren, das heißt, es wurde gewartet, bis die Zellen 30 vollständig zerstört waren (CPE), wurde das Virus geerntet und durch Zentrifugation und Filtration gereinigt. Hiernach erfolgte die AV-Inaktivierung mit Äthylenimin. Nach Sterilitäts- und Safetyprüfung wurden aus diesem inaktivierten AV-Antigen vier Vaccinen hergestellt.

Die Zusammensetzung der Vaccine ist nachfolgend in Tabelle 1 aufgeführt (Angaben in ml):

35

Vaccine

Adjuvans/Antigen	A	B	C	D
Al(OH) ₃ , 2%ig	20			
Zn(OH) ₂ , 0.1M		17		
Lecithin 99, 20%ig		3		
PAO			20	
BW 89 Adjuvanskombination				20
AV-Antigen	80	80	80	80
Gesamt	100	100	100	100

55

Zur Feststellung der lokalen Verträglichkeit wurden mit jeder Vaccine 2 Meerschweinchen, 450 g schwer, mit je 0,1 ml intraplantar geimpft.

Die Planten der Meerschweinchen wurden nach Impfung täglich 4 Wochen lang zur Beurteilung der

lokalen Verträglichkeit auf Rötung, Schwellung und andere sichtbare pathologisch, anatomische Veränderungen untersucht, und somit ein Punktwert der Unverträglichkeit ermittelt. Je schwerer die sichtbaren pathologisch, anatomischen Veränderungen sind, je höher ist der Punktwert, desto größer ist die Unverträglichkeit.

- 5 Die ermittelten Unverträglichkeitspunkte sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt:

	Vaccine				
	A	B	C	D	
10					
	Unverträglichkeits- punkte Tier 1	245	122,5	42,5	2,5
15					
	Unverträglichkeits- punkte Tier 2	257	187,5	82,5	2,5
20					
	Unverträglichkeits- punkte gesamt	502	310,0	125,0	5,0
	=====	=====	=====	=====	

Wie aus den Resultaten der Tabelle hervorgeht, ist die BW 89 Adjuvanskombination (Vaccine D) allen anderen Adjuvantien hinsichtlich lokaler Verträglichkeit weit überlegen.

Zur Beurteilung der Wirksamkeit der Vaccinen wurden den Meerschweinchen 4 Wochen p.v. Blut entnommen, und im Serum die neutralisierenden Antikörper gegen das AV bestimmt.

Die ermittelten Neutralisationstiter sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt.

	Vaccine				
	Tier	A	B	C	D
30					
	Tier 1	< 2	1 : 6	1 : 10	1 : 21
35					
	Tier 2	< 2	1 : 8	1 : 12	1 : 24

40 Wie die Resultate in dieser Tabelle zeigen, ist die Wirksamkeit der Adjuvanskombination (Vaccine D) besser als die der anderen Adjuvantien.

Bestimmung der allgemeinen Verträglichkeit:

45 Jeweils 10, 30g schwere NMRI Mäuse wurden mit den Vaccinen, die wie oben beschrieben hergestellt worden waren, mit je 0,3 ml s.c. vacciniert.

Zur Bestimmung der allgemeinen Verträglichkeit wurde bei den Tieren bis 8 Tagen p. v. täglich eine Gewichtskontrolle durchgeführt.

50 Die Gewichtszunahme bei den Tieren betrug mit

Vaccine A	11 g
Vaccine B	6 g
Vaccine C	8 g
Vaccine D	11 g
unbehandelte Kontrollen	10 g.

Die Gewichtszunahme zeigt klar, daß die Adjuvanskombination BW 89 eine gute allgemeine Verträglichkeit aufweist.

Beispiel 2:

- Pl₃- (Parainfluenza 3)-Virus wurde in DBK-Zellen vermehrt. Nachdem der Zellrasen der Kulturen 80 - 100 %ig virusspezifisch zerstört worden war, wurde geerntet und mittels Zentrifugation gereinigt. Hiernach 5 erfolgte die Inaktivierung des Virusantigens mit Ethylenimin. Nach Sterilitäts- und Safetyprüfung wurden aus dem inaktivierten Antigen 2 Vaccinen hergestellt;

Vaccine A enthielt (die %-Angaben zu den Vaccine-Zusammensetzungen sind als v:v zu verstehen):

10	Pl ₃ V - Antigen	80.0 %
	Al(OH) ₃ , 2%ig	19.5 %
	Saponin, Merck, 10%ig	0.5 %

Vaccine B enthielt:

15	Pl ₃ V - Antigen	80.0 %
	BW 89	20.0 %

Mit beiden Vaccinen wurden je 3 Schafe mit 2.0 ml s.c. vacciniert und 4 Wochen p. v. mit der gleichen Dosis revacciniert. Zur Prüfung der lokalen Verträglichkeit der Vaccine wurde die Injektionsstelle auf 20 Schwellungen, Rötungen, Konsistenz, Schmerhaftigkeit untersucht.

Bei der Vaccine A war 8 Wochen p. v. immer noch ein Impfknopen visibel, dessen Rückbildung auf Grund seiner festen Konsistenz noch mehrere Wochen benötigt. Wesentlich besser lokal verträglich war die Vaccine B. Zwischen 14 und 21 Tagen p. v. war an der Infektionsstelle kein Impfknopen mehr sicht- und palpierbar. Keines der Tiere, die mit Vaccine A oder B geimpft worden waren, zeigte Störungen des 25 Allgemeinbefindens.

Beispiel 3

Zur Prüfung auf Verträglichkeit wurden 2 Blindvaccinen (Blindvaccinen enthalten kein Antigen; anstelle 30 des Antigens wird Eagles 59 Medium zugefügt. Der Adjuvansgehalt ist aber gleich, wie in der Vaccine vorgesehen) nachfolgender Zusammensetzung hergestellt;

Vaccine A enthielt:

35	EB (physiologische Salzlösung + Vitamine + Aminosäuren)	90.0 %
	Al(OH) ₃ , 2%ig	10.0 %

Vaccine B enthielt:

40	EB	90.0 %
	BW 89	10.0 %

Mit Vaccine A wurden 3, mit Vaccine B wurden 6 Pferde s.c. mit 2.0 ml geimpft.

Die Tiere wurden 8 Tage lang täglich auf Lokalreaktionen untersucht. Die Resultate sind nachstehend tabellarisch zusammengefaßt.

45 Lokalreaktionen bei Pferden nach Vaccination mit Al(OH)₃ oder BW 89 enthaltenden Blindvaccinen

50

55

Tier Nr.	Vaccine	Lokalreaktionen in Tagen p. v.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1		C	D	D	C	C	C	C	C
2	A	C	C	D	D	D	D	C	C
3		C	D	D	D	C	C	C	C
4		O	O	O	O	O	O	O	O
5		O	O	O	O	O	O	O	O
6	B	A	A	B	O	O	O	O	O
7		A	A	O	O	O	O	O	O
8		C	O	O	O	O	O	O	O
9		C	O	O	O	O	O	O	O

Schwellungsgröße: O = nicht sichtbar, nicht palpierbar

A = erbsengroß

B = haselnußgroß

C = walnußgroß

D = hühnereigroß

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, ist BW 89 lokal wesentlich verträglicher als Al(OH)₃. Nennenswerte Allgemeinreaktionen traten bei keinem Tier auf.

40 Patentansprüche

1. Verwendung von Zinkhydroxid-Calciumhydroxid-Gel in einem Verfahren zur Adjuvierung einer Antigenlösung.
- 45 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein Lecithin verwendet wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich ein Polyalphaolefin verwendet wird.
- 50 4. Antigenlösung adjuviert nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antigenlösung Zinkhydroxid-Calciumhydroxid-Gel zugegeben worden ist.
5. Antigenlösung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antigenlösung zusätzlich 1-10 %, vorzugsweise 5 % einer 20%igen Lecithinsuspension zugegeben worden sind.
- 55 6. Antigenlösung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antigenlösung zusätzlich 1-40 %, vorzugsweise 10 % eines Polyalphaolefins zugegeben worden sind.

7. Verfahren zur Herstellung einer adjuvierten Antigenlösung, dadurch gekennzeichnet, daß einer Antigenlösung Zinkhydroxid-Calciumhydroxid-Gel zugegeben wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß einer Antigenlösung zusätzlich ein Lecithin zugegeben wird.
- 5 9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß einer Antigenlösung zusätzlich ein Polyalphaolefin zugegeben wird.

10 Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung einer adjuvierten Antigenlösung, dadurch gekennzeichnet, daß einer Antigenlösung Zinkhydroxid-Calciumhydroxid-Gel zugegeben wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer Antigenlösung zusätzlich ein Lecithin zugegeben wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß einer Antigenlösung zusätzlich ein Polyalphaolefin zugegeben wird.

20

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91103258.9

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
D, P Y	<u>EP - A1 - 0 363 835</u> (BEHRINGERWERKE) * Patentansprüche; Beispiele --	1-9	A 61 K 39/39
D, Y	<u>EP - A2 - 0 343 548</u> (BEHRINGERWERKE) * Patentansprüche * --	1-9	
A	<u>US - A - 4 552 756</u> (E.H. RELYVELD et al.) * Patentansprüche 1,4,5 * --	1,4,7	
A	<u>DE - A1 - 3 712 768</u> (RIBI) * Patentanspruch 1; Seite 4, Zeile 31 - Seite 5, Zeile 2 -----	1,2,5 8 *	
RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl.)			
A 61 K 39/00			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
WIEN	12-06-1991	IRMLER	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist		
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument		
A : technologischer Hintergrund	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument		
O : nichtschriftliche Offendarung			
P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		